

陕北小粒黑豆皮原花青素提取工艺及抗氧化性研究

Study on the extraction processing and antioxidant activity of procyanidins from small black bean coats in Northern Shaanxi

高晶晶 慕苗 闫君芝 刘丽娜

GAO Jing-jing MU Miao YAN Jun-zhi LIU Li-na

(榆林学院化学与化工学院, 陕西 榆林 719000)

(Chemistry and Chemical Engineering Department, Yulin University, Yulin, Shaanxi 719000, China)

摘要:提取陕北小粒黑豆皮中原花青素,考察乙醇浓度、提取时间、提取温度和液料比对其提取率的影响,利用Box-Behnken设计试验,建立提取过程的数学模型及二次多项式回归方程,预测出最优提取条件,并对提取的原花青素进行抗氧化性研究。结果表明,陕北小粒黑豆皮提取原花青素的优化工艺条件为提取时间4.2 h、提取温度53℃、液料比22:1(mL/g)、乙醇浓度60%,在该条件下提取率为5.380%;原花青素对DPPH自由基、羟基自由基和超氧阴离子均具有一定的清除效果,其 IC_{50} 值分别为0.075, 0.590, 0.220 mg/mL。

关键词:黑豆皮;原花青素;提取;抗氧化性

Abstract: Considering the influence of ethanol concentration, extraction time, extraction temperature and liquid-to-material ratio on the extraction rate, the experiments were proposed for procyanidins extraction, which was from small black bean coats in Northern Shaanxi, by single factor method and response surface methodology. The experiments were designed by the Box-Behnken of response surface software. The mathematical model of the extraction process and the regression equation of the model were established through experimental data. The optimum conditions of the extraction process were calculated by the mathematical model, and the antioxidant activity of procyanidins was also studied. The results showed that the optimum extraction conditions of the procyanidins from small black bean coats were as follows: extraction time 4.2 h, extraction temperature 53℃, the liquid to material ratio 22:1 (mL/g) and

ethanol concentration 60%. Under the optimized condition, the average extraction rate was 5.38%. The antioxidant activity study showed that abilities of procyanidins in black bean coats to scavenge DPPH and hydroxyl radical and superoxide anion were good, and the IC_{50} were 0.075, 0.590, 0.220 mg/mL respectively.

Keywords: small black bean coats; procyanidins; extraction; antioxidant

原花青素是由不同数量的儿茶素和表儿茶素结合而成的聚合物^[1],具有较强的抗氧化及清除自由基能力^[2],在预防和治疗心血管疾病、抗衰老、抗过敏、抗癌、抑菌等方面有显著作用^[3-6]。小粒黑豆是中国陕北地区种植的一种高产量黑豆品种,在黑豆产品加工过程中,豆皮大部分被去掉,豆皮的营养价值及其有效成分未被充分利用^[7-8]。研究^[9-11]表明,豆皮含有大量营养保健物质,尤其是黑紫色种皮含有大量的抗氧化性物质原花青素。目前,对黑豆皮的研究^[12]主要集中在膳食纤维、色素、黄酮等方面,对黑豆皮原花青素的研究^[13]鲜见报道,尤其是对其抗氧化性研究^[14]则更少。

目前原花青素常用的提取方法有乙醇溶液提取法、超临界提取法及双水相萃取法等^[15-16]。本研究拟采用乙醇溶液提取法,在单因素试验基础上,采用响应面法进行优化,得到黑豆皮原花青素的最佳提取工艺,并对其抗氧化性进行研究,以期原花青素的应用提供依据。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器

1.1.1 原料和试剂

陕北小粒黑豆皮:陕西神木产;

无水乙醇:分析纯,天津市致远化学试剂有限公司;

甲醇、 H_2O_2 :分析纯,天津市富宇精细化工有限公司;

基金项目:陕西省科技厅项目(编号:2017GY-136);榆林市科技计划项目(编号:2016CXY-09)

作者简介:高晶晶(1984—),女,榆林学院实验师,硕士。

E-mail: 349528103@qq.com

收稿日期:2019-01-04

浓盐酸:分析纯,南京化学试剂股份有限公司;

邻苯三酚、FeSO₄、水杨酸:分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司;

香草醛、Vc(抗坏血酸)、DPPH:分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

1.1.2 仪器与设备

电子天平:FA-1004 型,上海精科天平厂;

电热恒温鼓风干燥箱:DHG-9140A 型,上海一恒科学仪器有限公司;

数显超级恒温水浴:HH-501 型,郑州科丰仪器设备有限公司;

分光光度计:UV-2450 型,日本岛津公司。

1.2 方法

1.2.1 儿茶素标准曲线绘制 采用儿茶素作为标准品进行检测,准确配制浓度分别为 0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 mg/mL 儿茶素标准溶液,空白液为蒸馏水,取空白和各浓度的标准液 1 mL 于 6 支试管中,分别加入 5 mL 2% 香草醛—甲醇溶液,最后各加入 1 mL 浓盐酸振荡摇匀,于 500 nm 测其吸光度值^[17-18],以儿茶素标准液的浓度及吸光度值为横纵坐标,绘制标准曲线,得线性回归方程 $y = 1.089x + 0.0134$, $R^2 = 0.9984$ 。

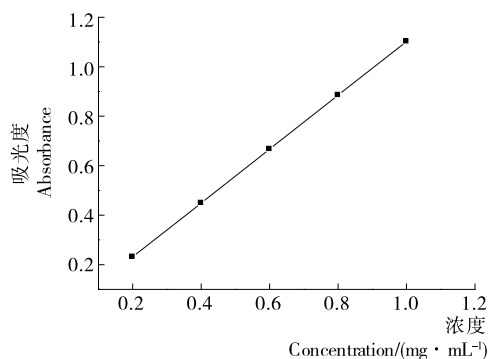


图 1 儿茶素标准曲线

Figure 1 The standard curve of catechin

1.2.2 黑豆皮原花青素含量的检测 采用香草醛—盐酸法。准确吸取原花青素提取液 1 mL,稀释一定倍数,后续操作与标准曲线制备相同。黑豆皮原花青素提取得率按式(1)计算。

$$R = \frac{c \times v}{1000m} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

R ——黑豆皮花青素提取得率,%;

c ——提取液中原花青素浓度,mg/mL;

v ——原花青素提取液体积,mL;

m ——黑豆皮质量,g。

1.2.3 单因素试验

(1) 提取液浓度对提取得率影响:准确称取 10 g 黑

豆皮粉末于三口烧瓶中,加入 150 mL 浓度分别为 50%,55%,60%,65%,70%的乙醇溶液,45 °C 下水浴恒温加热,冷凝回流,搅拌,提取 3.5 h,过滤,500 r/min 离心 10 min,测定上清液吸光度值,计算原花青素的提取得率。

(2) 提取时间对提取得率影响:准确称取 10 g 黑豆皮粉末于三口烧瓶中,加入 150 mL 60%乙醇溶液,45 °C 下水浴恒温加热,冷凝回流,搅拌,分别提取 3.0,3.5,4.0,4.5,5.0 h,后续方法同 1.2.3(1)。

(3) 提取温度对提取得率影响:准确称取 10 g 黑豆皮粉末于三口烧瓶中,加入 150 mL 60%乙醇溶液,分别于 40,45,50,55,60 °C 下水浴恒温加热,冷凝回流,搅拌,提取 4 h,后续方法同 1.2.3(1)。

(4) 液料比对提取得率影响:准确称取 10 g 黑豆皮粉末于三口烧瓶中,分别加入 100,150,200,250,300 mL 60%乙醇溶液,50 °C 下水浴恒温加热,冷凝回流,搅拌,提取 4 h,后续方法同 1.2.3(1)。

1.2.4 响应面试验 在单因素试验的基础上,以提取时间、提取温度、液料比为试验因素,以提取得率为评价指标,设计三因素三水平响应面试验优化原花青素提取工艺条件^[19]。

1.2.5 黑豆皮中原花青素的抗氧化性测定

(1) DPPH 自由基清除率:准确称取一定量的 DPPH 溶解于无水乙醇配制成浓度为 0.2 mmol/L 的溶液,放置于棕色瓶中保存,现配现用。取黑豆皮原花青素配制成浓度分别为 0.02,0.04,0.06,0.08,0.10 mg/mL 的溶液,取各浓度待测液 2 mL 分别加入 2 mL DPPH 乙醇溶液,摇匀,室温避光下静置 30 min,517 nm 下测定其吸光度值^[20]。同时还需空白对照及同条件下 Vc 的 DPPH 自由基清除率的测定。DPPH 自由基清除率按式(2)计算。

$$X = \left(1 - \frac{A_0 - A_1}{A_2}\right) \times 100\% \quad (2)$$

式中:

X ——DPPH 自由基清除率,%;

A_0 ——原花青素液和 DPPH 混合液的吸光度值;

A_1 ——原花青素液和空白溶剂(无水乙醇)混合液的吸光度值;

A_2 ——DPPH 溶液和空白溶剂混合液的吸光度值。

(2) 羟基自由基清除率:取 5 支试管分别加入 2 mL 1.8 mmol/L FeSO₄溶液和 2 mL 水杨酸溶液,摇匀后,分别加入 2 mL 浓度为 0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 mg/mL 的黑豆皮原花青素溶液,最后加入 2 mL 0.3% H₂O₂溶液,37 °C 下反应 30 min,510 nm 下测定吸光度值^[21]。同时还需做空白对照及同条件下 Vc 的羟基自由基清除率的测定。

羟基自由基清除率按式(3)计算。

$$Y = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\%, \quad (3)$$

式中:

Y——羟基自由基清除率, %;

A_0 ——空白液的吸光度值;

A_1 ——原花青素液的吸光度值。

(3) 超氧阴离子清除率:取 1 mL 浓度分别为 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg/mL 的黑豆皮原花青素溶液,依次加入 pH 8.2, 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲溶液 3 mL, 30 ℃ 水浴 20 min, 加入 7 mmol/L 邻苯三酚 3 mL 混匀, 反应 4 min, 加入 1 mL 浓盐酸终止反应, 320 nm 下测定吸光度值^[22]。同时还需做空白对照及同条件下 Vc 的超氧阴离子清除率的测定。超氧阴离子清除率按式(4)计算。

$$Z = \left(1 - \frac{A_0 - A_1}{A_2}\right) \times 100\%, \quad (4)$$

式中:

Z——超氧阴离子清除率, %;

A_0 ——原花青素液的吸光度值;

A_1 ——以 H₂O 代替邻苯三酚的吸光度值;

A_2 ——以 H₂O 代替原花青素液的吸光度值。

1.3 数据处理

用 Excel 2003 对试验所得数据进行统计计算, 单因

素试验采用 Origin 8.0 作图, 响应面优化采用 Design expert 10。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

由图 2(a)可知, 在乙醇浓度为 60% 时, 原花青素的提取效果较好, 其他浓度不利于原花青素的溶出。由图 2(b)得出提取时间为 4 h 时提取得率最高, 可能是由于超过 4 h 后, 一部分原花青素分解, 提取得率反而下降。由图 2(c)可知, 提取温度为 50 ℃ 时提取得率最高, 可能是其他温度不利于原花青素的溶出, 高温可能导致一部分原花青素分解。由图 2(d)得出原花青素的提取得率随液料比的增大而升高, 当液料比超过 20:1 (mL/g) 时, 增大溶剂用量并不能提高原花青素的提取得率。因此, 选择液料比为 20:1 (mL/g)。综上所述, 在乙醇浓度 60%、提取时间 4 h、提取温度 50 ℃、液料比 20:1 (mL/g) 时, 陕北小粒黑豆皮中原花青素的提取得率较高, 可达 5.25%。

2.2 响应面优化试验

2.2.1 试验设计与结果分析 根据单因素试验结果, 以原花青素提取得率为响应值, 根据 Box-Behnken 中心组合原理进行响应面设计, 试验因素水平见表 1, 试验设计与结果见表 2。

2.2.2 模型的建立及方差分析 由表 3 可知, 回归模型

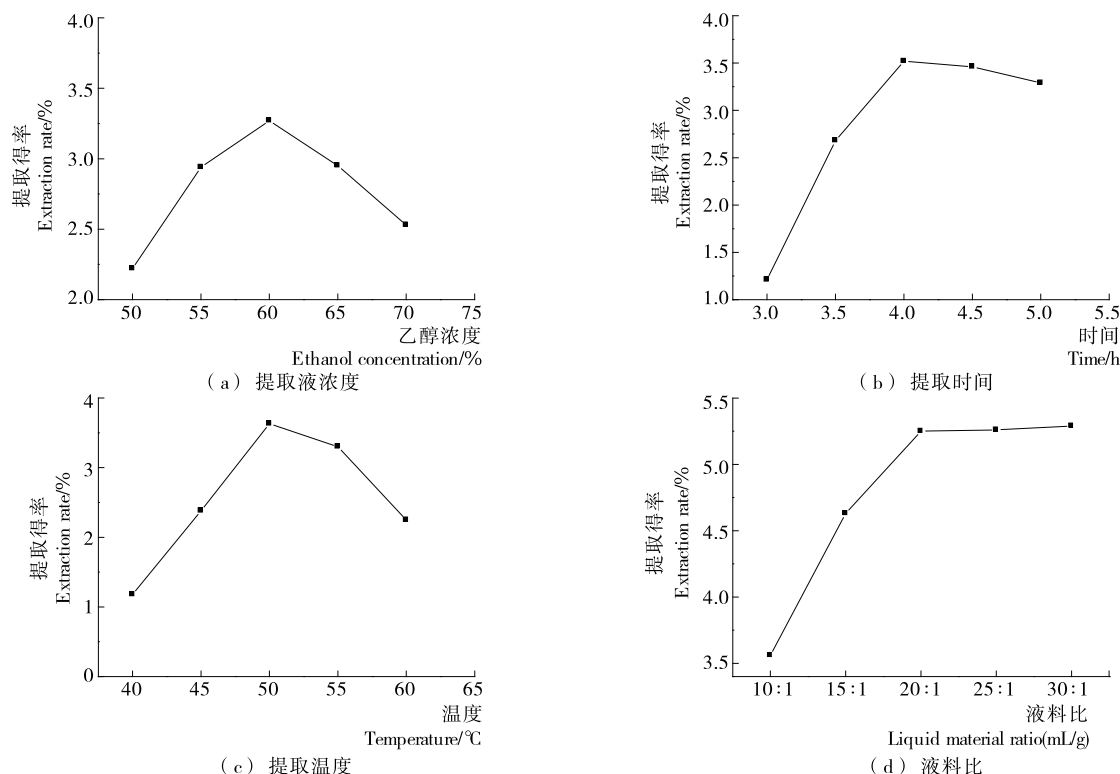


图 2 提取条件对黑豆皮中原花青素提取得率的影响

Figure 2 The effects of extraction conditions on the extraction rate of procyanidins from black bean coats

表 1 响应面因素与水平设计表

Table 1 The form of extraction factors and levels with response surface

水平	A 提取时间/h	B 提取温度/℃	C 液料比(mL/g)
-1	3.5	45	15
0	4.0	50	20
1	4.5	55	25

$P<0.000\ 1$, 达到高度显著水平, 失拟误差项 $P>0.05$, 不显著, 说明该模型误差小, 拟合度好; 可预测黑豆皮原花青素的提取过程及提取结果。BC、AC 项的 P 值 $<0.000\ 1$, 说明温度和液料比、时间和液料比的交互作用对提取得率的影响最大, 为主要限制因素; 从一次项的 P 值可知, 液料比对提取得率的影响最大, 其次是提取温度和提取时间。通过响应面软件的分析和计算, 得回归方程:

$$Y=5.32+0.099A+0.14B-0.15C-0.097AB-0.32AC-0.033BC-0.51A^2-0.85B^2-0.73C^2。$$
 (5)

2.2.3 响应面分析 由图 3 可知, 提取温度大于提取时间的影响, 液料比明显大于提取时间的影响, 液料比大于提取温度的影响, 与 2.2.2 中 P 值比较得出液料比 $>$ 提取温度 $>$ 提取时间一致。

由响应面法建立的提取模型及回归方程预测的最优提取工艺条件为提取时间 4.16 h、提取温度 52.77 ℃、液料比 22:1 (mL/g), 预测提取得率 5.463%。为便于操作, 将提取条件修正为提取时间 4.2 h、提取温度 53 ℃、液料比 22:1 (mL/g), 进行 3 次试验验证, 得到黑豆皮原花青素平均提取得率为 5.380%, 与预测值 5.463% 基本接近, 说明该提取模型预测优化黑豆皮原花青素提取工艺是准确可行的。

表 2 响应面试验方案与提取得率

Table 2 The experimental programme with response surface and the extraction rate

试验号	A	B	C	提取得率/%
1	-1	-1	0	3.78
2	1	-1	0	4.02
3	-1	1	0	4.11
4	1	1	0	3.96
5	-1	0	-1	3.76
6	1	0	-1	4.74
7	-1	0	1	4.07
8	1	0	1	3.79
9	0	-1	-1	3.65
10	0	1	-1	4.14
11	0	-1	1	3.45
12	0	1	1	3.81
13	0	0	0	5.25
14	0	0	0	5.47
15	0	0	0	5.49
16	0	0	0	5.09
17	0	0	0	5.28

2.3 原花青素抗氧化性试验

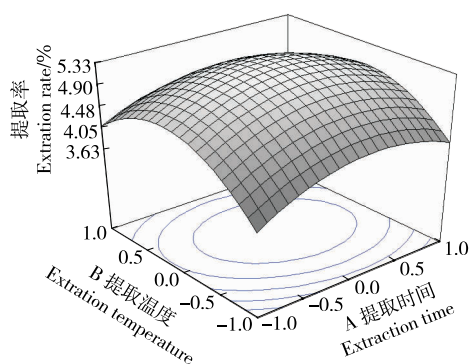
2.3.1 DPPH 自由基清除率 从图 4 可以看出, 随着原花青素和 V_c 浓度的增加, DPPH 自由基清除率逐渐增加。同浓度下, V_c 对 DPPH 自由基清除率均略高于原花青素。浓度均为 0.10 mg/mL 时, 原花青素的清除率为 68.5%, 而 V_c 的清除率可达 73.8%。黑豆皮原花青素的 IC_{50} 值为 0.075 mg/mL。结果表明: 黑豆皮原花青素对

表 3 提取模型的显著性检验及分析表[†]

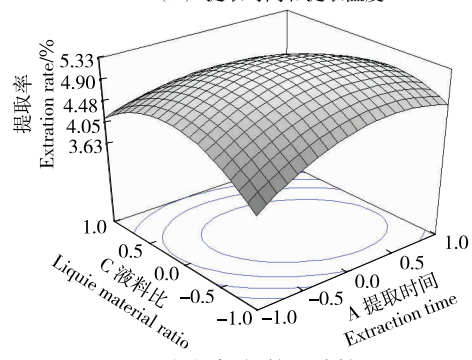
Table 3 The table about significance test of the extraction model and analysis

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
回归模型	7.75	9	0.860	30.01	$<0.000\ 1$	高度显著
A	0.08	1	0.078	2.72	0.143 1	
B	0.16	1	0.160	5.47	0.052 0	
C	0.17	1	0.170	5.97	0.044 6	
AB	1.10	1	1.100	38.25	0.000 5	
AC	2.96	1	2.960	103.08	$<0.000\ 1$	
BC	2.16	1	2.160	75.15	$<0.000\ 1$	
A ²	0.04	1	0.038	1.33	0.287 4	
B ²	0.40	1	0.400	13.84	0.007 5	
C ²	4.23×10^{-3}	1	4.225×10^{-3}	0.15	0.712 5	
残差	0.20	7	0.029			
失拟误差	0.09	3	0.030	1.08	0.451 0	不显著
纯误差	0.11	4	0.028			
总差	7.95	16				

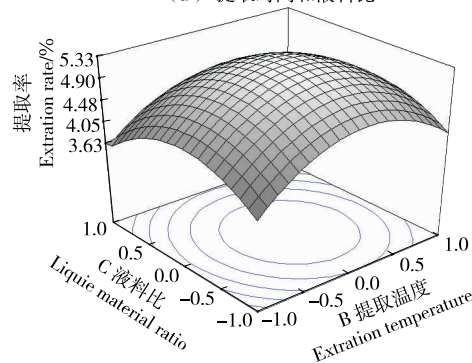
[†] $P<0.000\ 1$ 差异高度显著; $P<0.05$ 差异显著; $P>0.05$ 差异不显著。



(a) 提取时间和提取温度



(b) 提取时间和液料比



(c) 提取温度和液料比

图3 两因子交互作用对提取率的响应面图

Figure 3 Response surface of mutual-influence of two factors on extraction rate

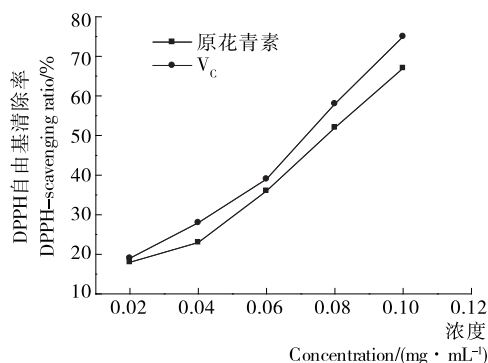


图4 原花青素对DPPH自由基的清除作用

Figure 4 Scavenging effect of procyanidins on DPPH· radicals

DPPH 自由基清除率与 V_c 基本接近,且在一定的范围内其浓度与 DPPH 自由基清除率存在一定的量效关系。

2.3.2 羟基自由基清除率 从图5可以看出,随着原花青素和 V_c 浓度的增加,羟基自由基清除率逐渐增加,但增加速率逐渐变缓。同浓度下, V_c 对羟基自由基清除率略高于原花青素。浓度为 1.0 mg/mL 时,原花青素的清除率为 68.7%, V_c 的清除率为 74.3%。黑豆皮原花青素的 IC_{50} 值为 0.590 mg/mL。结果表明:黑豆皮原花青素对羟基自由基清除率与 V_c 基本接近,有较好的羟基自由基清除能力。

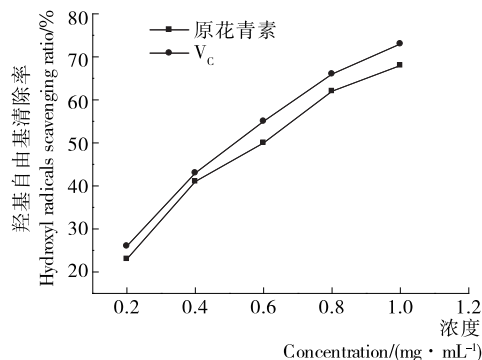


图5 原花青素对羟基自由基的清除作用

Figure 5 Scavenging effect of procyanidins on hydroxyl radicals

2.3.3 超氧阴离子清除率 从图6可以看出,随着原花青素和 V_c 浓度的增加,超氧阴离子清除率增加。 V_c 的清除率大于原花青素的。浓度为 0.5 mg/mL 时,原花青素清除率为 77.6%, V_c 清除率为 82.5%。黑豆皮原花青素的 IC_{50} 值为 0.220 mg/mL。

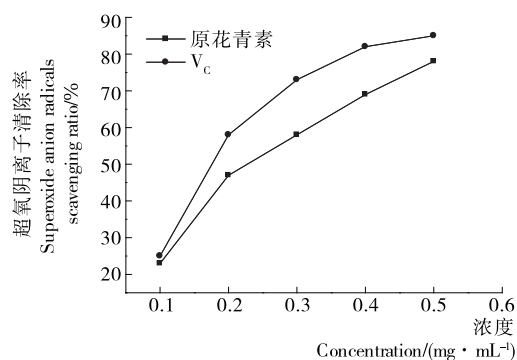


图6 原花青素对超氧阴离子的清除作用

Figure 6 Scavenging effect of procyanidins on superoxide anion radicals

3 结论

本试验对陕北小粒黑豆皮原花青素提取进行了研究,在单因素试验基础上采用响应面法优化,得到最佳提取工艺条件为提取时间 4.2 h、提取温度 53 °C、料液比

22:1(mL/g)、乙醇浓度 60%,在此条件下陕北小粒黑豆皮原花青素平均提取得率为 5.380%。黑豆皮原花青素的抗氧化性试验研究表明原花青素对 DPPH 自由基、羟自由基和超氧阴离子均具有一定的清除效果,该抗氧化能力与原花青素浓度有一定的关系,其 IC_{50} 值分别为 0.075, 0.590, 0.220 mg/mL。通过本试验说明陕北小粒黑豆皮原花青素含量可观且具有较好的抗氧化活性,后续可对黑豆皮中原花青素的抗氧化有效成分作进一步研究。

参考文献

- [1] 余修亮,朱志平,李佳桥,等. 莲子壳原花青素超声提取工艺优化及其抗氧化活性[J]. 中国食品学报, 2018, 18(12): 99-109.
- [2] 刘新,余小平,游江舟,等. 荔枝皮中原花青素提取工艺优化及其黄烷-3-醇 HPLC 分析[J]. 食品与机械, 2012, 28(6): 154-158.
- [3] 韦琴. 板栗壳中原花青素含量检测方法的比较研究[J]. 食品与机械, 2016, 32(3): 77-81.
- [4] 丁晓旭,尹洋,崔相国,等. 原花青素对喉癌 TU686 细胞增殖、凋亡的影响[J]. 解剖科学进展, 2018, 24(6): 584-587.
- [5] ZHOU Qian, HAN Xue, LI Rong-bin, et al. Anti-atherosclerosis of oligomeric proanthocyanidins from *Rhodiola rosea* on rat model via hypolipemic, antioxidant, anti-inflammatory activities together with regulation of endothelial function[J]. *Phytomedicine*, 2018, 51(11): 171-180.
- [6] 李海超,吕鹏,陈飞儿,等. 原花青素的抗肿瘤机制研究现状[J]. 吉林医药学院学报, 2017, 38(1): 64-66.
- [7] 秦琦,张英蕾,张守文. 黑豆的营养保健价值及研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2015, 25(7): 145-150.
- [8] 王巧环,江均平,傅慧敏,等. 绿豆、红小豆和黑豆种皮 18 种元素分析[J]. 食品科学, 2015, 36(20): 126-129.
- [9] 沈蒙,康子悦,葛云飞,等. 酶法改性提取黑豆皮可溶性膳食纤维及性质的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(6): 1 046-1 053, 1 084.
- [10] 蒋新龙,蒋益花. 黑豆皮花色苷酯化修饰及其降解与抗氧化特性[J]. 中国粮油学报, 2018, 33(9): 34-41.
- [11] 张翠,张丽娟,刘占云,等. 比色法测定不同产地黑豆皮中总黄酮的含量[J]. 食品工业科技, 2013, 34(1): 309-311, 316.
- [12] 沈蒙,曹龙奎. 提取黑豆皮中可溶性膳食纤维的工艺研究[J]. 中国食品添加剂, 2017, 27(9): 82-87.
- [13] 朱学仲,赵文,林淑鑫,等. 黑豆种皮中原花青素的提取和纯化研究[J]. 现代食品科技, 2018, 34(1): 154-160.
- [14] 李勇,李代魁,李忠平,等. 黑豆皮中原花青素含量测定及抗氧化活性研究[J]. 农产品加工, 2019(3): 60-63.
- [15] 张喜峰,程广,何倩,等. 双水相萃取分离葡萄籽中原花青素[J]. 食品与机械, 2017, 33(3): 168-173.
- [16] 张喜峰,陈雨迪,崔晶,等. 锁阳原花青素提取方法及抗氧化和抗糖基化研究[J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(12): 2 039-2 048.
- [17] 李春阳,许时婴,王璋. 香草醛—盐酸法测定葡萄籽、梗中原花青素含量的研究[J]. 食品科学, 2004, 25(2): 157-161.
- [18] 文魁山. 葡萄籽原花青素高聚体的解聚方法与条件优化的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2018: 19-23.
- [19] 高晶晶,慕苗. 陕北小粒黑豆中黄酮的提取工艺研究[J]. 河南科学, 2018, 36(9): 1 367-1 371.
- [20] ZHENG Lin, LIN Lian-zhu, SU Guo-wan, et al. Pitfalls of using 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) assay to assess the radical scavenging activity of peptides: Its susceptibility to interference and low reactivity towards peptides[J]. *Food Research International*, 2015, 76(6): 359-365.
- [21] 付晶晶,肖海芳,宋元达. 金银花等 6 种植物提取物总黄酮含量与抗氧化性相关性研究[J]. 食品与机械, 2017, 33(6): 159-163.
- [22] 符群,吴桐,王梦丽. 负压超声法提取刺玫果黄酮及其抗氧化性研究[J]. 现代食品科技, 2019, 35(1): 1-10.
- (上接第 17 页)
- [22] SEELY J E, RICHEY C W. Use of ion-exchange chromatography and hydrophobic interaction chromatography in the preparation and recovery of polyethylene glycol-linked proteins[J]. *Journal of Chromatography A*, 2001, 908(1): 235-241.
- [23] SCARAMUZZA S, TONON G, OLIANAS A, et al. A new site-specific monoPEGylated filgrastim derivative prepared by enzymatic conjugation: Production and physicochemical characterization[J]. *Journal of Controlled Release*, 2012, 164(3): 355-363.
- [24] EL-ZAHAR K, SITOBY M, DALGALARRONDO M, et al. Purification and physicochemical characterization of ovine beta-lactoglobulin and alpha-lactalbumin [J]. *Die Nahrung*, 2004, 48(3): 177-183.
- [25] MU Qi-meng, HU Tao, YU Jing-kai. Molecular insight into the steric shielding effect of PEG on the conjugated staphylokinase: Biochemical characterization and molecular dynamics simulation[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): 1-10.
- [26] BALL G, SHELTON M J, WALSH B J, et al. A major continuous allergenic epitope of bovine beta-lactoglobulin recognized by human IgE binding[J]. *Clinical & Experimental Allergy*, 1994, 24(8): 758-764.
- [27] CLEMENT G, BOQUET D, FROBERT Y, et al. Epitopic characterization of native bovine β -lactoglobulin [J]. *Journal of Immunological Methods*, 2002, 266(1): 67-78.
- [28] WAL J M. Structure and function of milk allergens[J]. *Allergy*, 2001, 56(67): 35-38.